

山形医学 2005 ; 23 (1) : 83-96

Non-apoptotic プログラム細胞死： アポトーシスとは形態・制御機構を 異にするプログラム細胞死の存在と意義について

北中千史

山形大学医学部器官機能統御学講座腫瘍分子医科学分野
(平成16年9月13日受理)

要 旨

多細胞生物体の細胞は「自殺」のための遺伝子プログラムを内蔵している。このようなプログラムの活性化によって引き起こされる細胞の自殺は個体の正常な形成や恒常性維持、逆の見方をすれば疾患の予防、において重要な役割を果たしている。ごく最近までプログラム細胞死は事実上アポトーシスと同義語のように用いられてきたが、近年になってアポトーシスとは形態も制御機構も異なる (non-apoptotic) プログラム細胞死の存在が明らかになり、プログラム細胞死には多様性があることがわかってきた。さらに、このような non-apoptotic プログラム細胞死が神経変性疾患やがん等の疾患に深く関わっていることも示唆されている。本総説では non-apoptotic プログラム細胞死に関するこれまでの知見を紹介しつつ、プログラム細胞死が関与する疾患の研究において「プログラム細胞死の多様性」を認識することが如何に重要であることを強調する。

キーワード：プログラム細胞死、アポトーシス、non-apoptotic、autophagic degeneration、Ras

はじめに

多細胞生物を構成する細胞は自らを死に至らしめるための機能（遺伝子プログラム）を内蔵しており、そのようなプログラムの活性化により誘導される能動的・自律的な細胞死（プログラム細胞死）は、組織中で不要あるいは有害になった細胞を排除することにより正常な発生や成体の恒常性維持に貢献している。このような事実を反映して、プログラム細胞死の制御異常

が多くの疾患の基礎となっていることも明らかとなってきた。したがってその制御メカニズムを理解し、利用することができれば今後様々な疾患の病態解明とともに新たな予防法・治療法の開発が期待できる。このような期待感から現在も数多くの医学研究者によって細胞死研究そのもの、あるいは細胞死に絡めたかたちで疾患研究が行なわれている。ところで「プログラム細胞死研究」というと今でもまだ多くの研究者が「すなわちアポトーシス研究」と考えているが、これは必ずしも正しくない。後で述べるよ

別刷請求先：北中千史（山形大学医学部器官機能統御学講座 腫瘍分子医科学分野）〒990-9585
山形市飯田西2-2-2

うなプログラム細胞死研究の流れの中でいつの間にか「プログラム細胞死」=「アポトーシス」という固定観念が広く定着してしまったが、実際にはアポトーシスはプログラム細胞死の1つにすぎない。このことはプログラム細胞死の観点から疾患研究を行う場合非常に重要な点であり、アポトーシスしか想定せずに研究を進めた場合、大切な事実をやすやすと見逃してしまう結果に終わりがかねない。そこで本総説ではプログラム細胞死研究の辿ってきた道を振り返りながら「アポトーシスとは形態も制御機構も異なる (non-apoptotic) プログラム細胞死」の概念がどのように形成されてきたかを紹介するとともに、このような細胞死と疾患の関わりについても触れてみたい。

プログラム細胞死とアポトーシス

以降の議論に混乱のないよう、まず始めに「アポトーシス」、「プログラム細胞死」といった用語・概念をその定義に戻って確認しておく。1972年にアポトーシスの概念を初めて提唱した Kerr らはもともと病理学者であり、電子顕微鏡レベルで様々な細胞死を観察している過程で一定の形態学的特徴 (核・細胞質の濃縮・断片化、周辺細胞による迅速な取り込み、散発的・孤立的な発生) を示す細胞死を見出し、apoptosis (アポトーシス) と命名した¹⁾。従って、アポトーシスの定義は本来電子顕微鏡所見に基づく形態学的なものである。これに対してプログラム細胞死という用語は本来機能的なものである。この用語はアポトーシスという用語の出現より前、1965年に Lockshin らがカイコの変態過程でおきる intersegmental muscle の細胞変性を指して用いており (興味深いことに、この細胞死はアポトーシスではなく後に述べる autophagic degeneration である²⁾)、そのオリジナルな意味は一定の時期・部位に再現性よくおきる「予定 (計画) された (developmentally programmed)」細胞死ということになる。さらに、このことは

すなわちそのような細胞死が遺伝子レベルで制御される細胞死であることを暗示するものであり、従ってプログラム細胞死は「細胞内に蔵された遺伝子プログラムの活性化により誘導される (regulated by intrinsic genetic program)」細胞死を指す言葉としても用いられるようになった。このように「プログラム細胞死」には2通りの使い方ががあるが、発生学の領域において時に前者の意味で使われることがあるものの、近年では圧倒的に後者の意味において用いられることが多く、本稿でも原則的にそのような使い方を。ところで何故にプログラム細胞死とアポトーシスが混同して使われるようになってきたか。それはひとつには1980年代初頭に Wyllie らが細胞死をアポトーシスとネクローシスの二つに大別したことがきっかけであろう³⁾。直感的に分かりやすくするためだと思われるが、この分類にあたって Wyllie らは形態と機能をカップルさせた、すなわち「アポトーシス=制御された細胞死」、「ネクローシス=アポトーシスの特徴を示さない、制御されない細胞死」としたのである。ここには「アポトーシスではないけれども、制御された細胞死」が入り込む余地はない。細胞死が遺伝子により制御される能動的現象であるとの考え方がまだまだ一般的でなかった当時、細胞死を見た目で「自殺」と「他殺」に2分割するこの単純明快な図式がプログラム細胞死の概念や研究の普及に絶大な貢献をしたことは疑いない。ただ残念ながら、現在ではその負の側面が取り残されたかたちになっている。

アポトーシスとは形態を
異にする生理的細胞死

さて前述のように、理屈の上ではプログラム細胞死は必ずしもアポトーシスではない。しかしながら現実問題としてアポトーシス以外のプログラム細胞死が存在しなければプログラム細胞死=アポトーシスとして問題ないはずである。それでは、アポトーシス以外のプログラム

Non-apoptotic プログラム細胞死

表 1. 生理的細胞死の形態学的分類

	タイプ 1 (Apoptosis)	タイプ 2 (Autophagic degeneration)	タイプ 3 (Non-lysosomal disintegration)
核	顕著な濃縮を示す	時に濃縮が見られることもあるが、顕著ではない	後期に崩壊
細胞質	容積の減少	早期にリソソームの増大、自喰小胞（オートファゴソーム・オートリソソーム）の出現	全般的な崩壊、細胞内小器官の拡張
終末像	断片化し、周辺細胞によるどん喰を介し迅速に処理される	断片化し、後に周辺細胞によりどん喰処理されることもある	非常に細かい断片に分断化し、周辺細胞によるどん喰処理はみられない
頻度・部位	しばしば見られる細胞死のタイプで、孤立した状態でおきることが多い	しばしば見られる細胞死のタイプで、細胞がまとまって脱落する状況でおきることが多い	稀。空胞化軟骨細胞でのみ確認されている

この表は Schweichel and Merker: Teratology 1973;7:253(文献 4) \ Clarke: Anat Embryol 1990;181:195(文献 5) \ Zakeri et al.: Cell Death Differ 1995;2:87(文献 6) に基づき、生理的細胞死の 3 つのタイプの特徴的所見をまとめたものである。

細胞死は存在するのだろうか？

実は Kerr ら と ほぼ 同 じ 頃、1973 年 に Schweichel、Merker ら の 全 く 別 の 研 究 グループがやはり電子顕微鏡を用いて齧歯類の発生過程で生理的におきる様々な細胞死を観察しており、そのような細胞死がおよそ 3 種類に分類できることを明らかにしている (表 1)⁴⁾。一つめのタイプ (タイプ 1) の細胞死は常に孤立した状態でおきており、早期より核と細胞質の濃縮を特徴とするものであった。死細胞はついで分断化し周囲の細胞により貪喰される。このタイプ 1 細胞死は明らかに Kerr ら の 言 う アポトーシスと同一のものと考えられる。二つめのタイプ (タイプ 2) の細胞死は細胞質における自喰小胞 (オートファゴソーム、オートリソソーム) \ 自喰空胞の出現を特徴とするものであり、別名 autophagic degeneration と も 呼 ば れ る^{5), 6)}。死細胞は後に分断化し、周囲の細胞により貪喰された。このタイプの細胞死は細胞がまとまって脱落するような状況で認められた。三つめのタイプ (タイプ 3) はミトコンドリアなどの細胞内小器官の空胞化に始まり次いで非常に細かい断片への分断化が見られたが、リソソームの関与はなく周辺細胞の反応も見られなかった。

このタイプの細胞死は空胞化軟骨細胞において認められた。この Schweichel と Merker により提唱された分類の妥当性はその後 Clarke⁵⁾ や Zakeri ら⁶⁾ の総説においても確認されている。すなわち、Schweichel と Merker の 分 類 に よ るタイプ 1 から 3 の細胞死はいずれも確かに動物の正常な発生過程において認められており、なかでも核変化に乏しく自喰変化の出現を特徴とするタイプ 2 細胞死はアポトーシスであるタイプ 1 細胞死と同様に広く無脊椎動物から哺乳動物に至るまで高頻度に認められている。以上のような観察所見から、アポトーシスとは異なった形態を示す生理的な細胞死が動物の生体内でおきていることは古くから疑いようのない事実であった。ただ、発生過程における一定の時期・部位に再現性よく出現しているという事実はそれらの細胞死が遺伝子レベルで制御されるプログラム細胞死であることを強く示唆してはいたものの、残念ながら当時それを実証する術はなかった。結局、タイプ 2 細胞死が遺伝子の機能発現により誘導されるプログラム細胞死であることやその制御機構がアポトーシスとは本質的に異なるものであることが我々の手によって明らかにされ (後述) \ アポトーシスとは形

態・制御機構を異にするプログラム細胞死の存在が現実的なものとなるまでには、タイプ2細胞死の最初の形態学的記述から四半世紀の年月を要することとなった。

アポトーシスとは制御機構を異にする
(カスパーゼ非依存的) プログラム細胞死

このようにプログラム細胞死の概念がアポトーシスのそれよりもずっと以前から存在し、かつまた生理的細胞死の形態学的な多様性が指摘されていたにもかかわらず、なぜアポトーシスだけがこれほどまでに注目されるようになったのか？これは細胞死が死に行く運命にある細胞自身の遺伝子プログラムにより自律的に制御されていることを示した先駆的研究において、モデルとして用いられた線虫のプログラム細胞死がアポトーシスであったことが一つの大きな要因と考えられる。線虫 *C. elegans* ではその発生過程において特定の細胞が特定の時期に細胞死によって除去されることが知られており、遺伝学的な解析の結果からこのような細胞死に必要とされる幾つかの遺伝子 (*ced* = *cell death abnormal*) が見い出された^{7), 8)}。1980年代後半のことである。さらにこれら線虫の自律的細胞死の制御に関わる遺伝子 *ced* に対応する哺乳動物の遺伝子の存在が1990年代に入って次々と明らかとなり、線虫から哺乳動物まで高度に保存されたアポトーシスの基本制御機構が解明され^{9), 10), 11)}、1990年代後半のアポトーシス研究の黄金期を迎えることとなった¹²⁾。線虫のモデルを駆使して細胞死遺伝子を同定し、遺伝子レベルで制御される能動的・自律的細胞死(すなわちプログラム細胞死)の存在を実証した Horvitz はこの業績により2002年のノーベル賞を受賞している^{13), 14)}。このようにプログラム細胞死の研究はまさにアポトーシスを題材として一気に展開してきたわけであり、このような経緯も「プログラム細胞死すなわちアポトーシス」という風潮を生み出すのに一役買ってきた。それではなぜここに至ってアポトーシス以外のプ

ログラム細胞死が注目されるようになってきたのか？ *C. elegans* におけるプログラム細胞死の実行に必要とされる遺伝子 *ced-3* は現在カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼをコードしていることが明らかにされた^{9), 15), 16)}。カスパーゼに関する当初の研究結果はカスパーゼがアポトーシスに伴って活性化されること、カスパーゼ活性の抑制によりアポトーシスが抑制されることを示しており、このプロテアーゼが線虫から哺乳動物にいたるまでアポトーシス制御の中心的な役割を果たしているという考え方を支持するものであった^{17), 18)}。そして、一時はこれでアポトーシス、ひいてはプログラム細胞死の実行機構の大枠は解明されたのではないかと考えられるようになった。ところがその後カスパーゼの活性を抑制した状態でもプログラム細胞死そのものは抑制されないという実験事実が続々と報告されるようになり、いやが上にもアポトーシスとは異なった実行機構をもつプログラム細胞死の存在を想定せざるを得ない状況となってきたのである。

1990年代半ばから一般的に使用されるようになったカスパーゼ阻害剤や、あるいはカスパーゼ経路に関わる遺伝子をノックアウトした動物を用いた実験の結果は、こと「アポトーシス」を指標とする限りカスパーゼがアポトーシスの実行因子であることを明確に示していた。つまりカスパーゼの活性を抑制するとアポトーシスの特徴である核の濃縮やヌクレオソーム単位のDNA断片化などは確かに抑制される。この結果だけを見て当初はカスパーゼがあたかも「細胞死」の実行因子であるような錯覚に陥った研究者も少なからずいたものと思われる。しかしながら注意深く観察していると、カスパーゼ阻害により「アポトーシスに特徴的な形態、生化学的变化」は抑制されるけれども、それでも細胞が「死んでしまう」ことが実にしばしば起きてくる。しかもその細胞死は例えば Bcl-2 発現により抑制可能であるなど遺伝子レベルで制御可能である。こういった事実に気付いた研究者

らによる報告が1990年代末から相次ぐようになり^{19),20),21)}、少なくとも実験室レベルでは「カスパーゼ非依存的な、アポトーシスとは異なるプログラム細胞死」が存在すること、かつそれが例外的な存在ではなくむしろ純粋なアポトーシスによる細胞死の方が稀なのではないかと思わせるほど、よくある存在であることが認識されるようになってきた。

Ras シグナル伝達因子により制御される
non-apoptotic プログラム細胞死：
形態と制御機構の接点として

このように、少なくとも実験室レベルではアポトーシスとは異なった制御機構をもつ細胞死の存在が確認され、その一方で古くからアポトーシスとは異なった形態学的特徴を示す生理的細胞死が存在することもわかっていった。ただ前者についてはあくまで実験的に作り出された特殊な状況下だけで見られる「人工的」プログラム細胞死である可能性を否定することはできなかったし、後者については果たしてこのような生理的細胞死が実際に遺伝子によって制御されているか否かは明らかでなかった。つまり実験室条件下でも自然の生体内でも「アポトーシスとは異なるプログラム細胞死」の存在を強く示唆する所見がありながら、これらはあくまで別個のもので、有機的に結びついてその存在を実証するところまではいかなかった。このような状況の中で、これら2つの要素を結びつけたのが Ras によって制御される non-apoptotic 細胞死である。

我々が Ras により制御される non-apoptotic 細胞死を見出したのは全く偶然の所産である²²⁾。ras 遺伝子は細胞内シグナル伝達因子として機能する Ras 蛋白質をコードする遺伝子であるが、同時に様々なヒトがんにおいて高頻度に変異の見られる代表的がん遺伝子としてもよく知られている。そのような中で脳腫瘍の代表である神経膠腫（グリオーマ）ではなぜかこの ras 遺伝子の変異が全く見られない。我々はこ

の変異が「全くない」ことに興味を抱き、ことグリオーマ細胞に対しては他のがん細胞とは異なり Ras の変異（その結果 Ras は常時活性化状態になる）が細胞の生存や増殖に対してマイナスの働きをしているのではないかと予想した。そしてこのような仮説を確かめるべく、がんで見られる変異活性型 Ras をグリオーマ細胞内に発現させてみた。その結果、細胞死が誘導された点は予想どおりであったが、その死には全く予想外であった。当時は我々自身もアポトーシスしか念頭になく Ras により誘導された細胞死もアポトーシスではないかと期待していたが、TUNEL アッセイを含む諸種の検討の結果、アポトーシスとは異なる細胞死であることが示唆された。そこで電子顕微鏡による超微形態の検討を行ったところ、変性の進行した細胞では細胞質内に多くの空胞が認められたが、核やミトコンドリアには顕著な変化は認められないなど、Ras により誘導される細胞死がアポトーシスとは異なるものであることがまず確認された（図1）。さらに詳細に観察すると、空胞の中には細胞質成分と思われる内容物を含むものもあり、これらはオートファゴソーム、オートリソソームに由来するものと考えられた（図2 Tc(-), Day 5）。また細胞変性の初期像を電子顕微鏡により観察したところ、空胞の出現に先立ってリソソーム構造の増大を認めた（図2 Tc(-), Day 1.5）。そしてこれらの所見は驚くべきことに Schweichel、Merker らがアポトーシス（タイプ1細胞死）とは異なる生理的細胞死として記述していたタイプ2細胞死⁴⁾（autophagic degeneration^{5), 6)}に完全に一致するものであった。一方我々は、このような細胞死が細胞内に人為的に遺伝子を発現させたことにより起きる非特異的反応ではなく、確かに Ras 蛋白質のシグナル伝達因子としての活性に依存して引き起こされるプログラム細胞死であることも確認した。従ってこれらの結果は、ras 遺伝子（の機能発現）により制御されるグリオーマ細胞のプログラム細胞死がタイプ2細胞

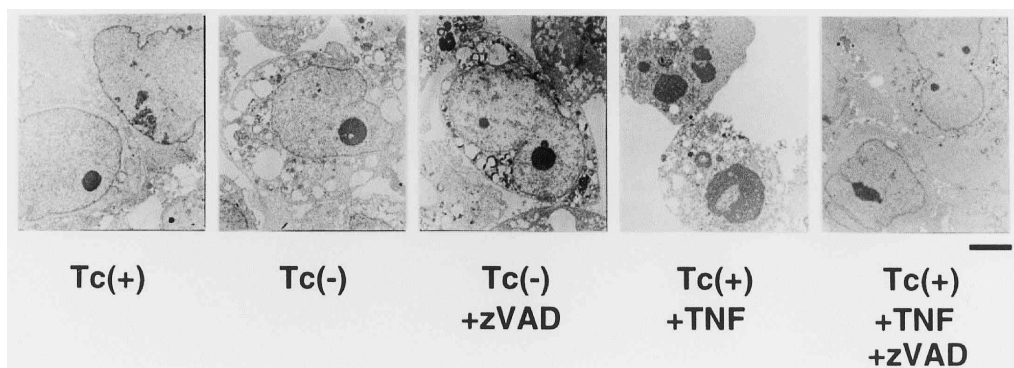


図 1 . Ras 誘導細胞死の透過電子顕微鏡像

U251TA-RasV12 細胞は培地からテトラサイクリンを除去することにより活性型 H-Ras (RasV12) の発現を誘導できる U251 ヒトグリオーマ細胞株のステーブルトランスフェクタントである。U251TA-RasV12 細胞をテトラサイクリン存在下 (Tc(+))、非存在下 (Tc(-)) で 5 日間培養した。Tc(-)+zVAD は 100 μ M の zVAD-fmk を加えてテトラサイクリン非存在下で 5 日間培養した。Tc(+)+TNF はテトラサイクリン存在下で tumor necrosis factor (TNF) (30 ng/ml) および cycloheximide (20 μ g/ml) を加えて 24 時間培養、Tc(+)+TNF+zVAD ではさらに 100 μ M の zVAD-fmk の存在下で培養した。広域カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk は TNF- によるアポトーシス形態の誘導を抑制するが、Ras により誘導される non-apoptotic な形態学的変化は抑制しない。Scale bar = 5 μ m。 (文献 22、Chi et al.: Oncogene 1999;18:2281 より)

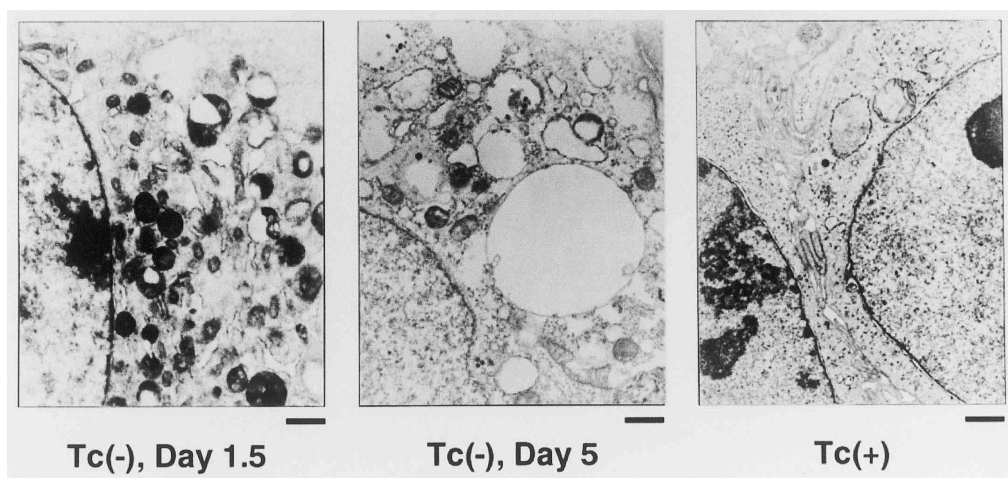


図 2 . Ras 誘導細胞死の透過電子顕微鏡像 (強拡大)

U251TA-RasV12 細胞をテトラサイクリン非存在下で 1.5 日間 (Tc(-), Day 1.5) あるいは 5 日間 (Tc(-), Day 5) 培養した。Tc(+) は U251TA-RasV12 細胞をテトラサイクリン存在下で培養したもの。Scale bar = 1 μ m。 (文献 19、Kitanaka C & Kuchino Y: Cell Death Differ 1999;6:508 より)

胞死 (autophagic degeneration) であることを示している。そしてこのことは次のような重要な意義をもっている。第一に、タイプ2生理的細胞死がプログラム細胞死の一形態であることを初めて示したということ。そして第二には、「*ras* の変異がグリオーマで認められないのは、*ras* に変異を来したグリオーマ細胞が non-apoptotic 細胞死による自殺をおこして排除されてしまうためである」すなわち「non-apoptotic プログラム細胞死ががん排除・抑制機構として機能している」可能性を初めて示唆したことである。

生体内における Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死の役割 : がん排除機構としての non-apoptotic プログラム細胞死

さて、このように我々の得た結果は non-apoptotic プログラム細胞死の存在と役割について非常に重要な示唆を与えるものであるが、

データそのものは *in vitro* の実験から得られたものにすぎない。従って生体内で実際に起きている non-apoptotic 細胞死 (特にタイプ2細胞死) が遺伝子 (*ras*) レベルで制御されるプログラム細胞死であること、そしてそのような細胞死が生体内でがん細胞の排除機構として機能していることについて必ずしも証明されたわけではない。しかしながら、生体内で起きている自然現象としての non-apoptotic プログラム細胞死の存在と意義を確立するためには是非ともこの点を実証しておく必要がある。そこで我々が着目したのが神経芽腫の自然退縮現象である。

神経芽腫は代表的小児がんの一つであるが、いったん形成された腫瘍が治療によらず縮小・消失 (自然退縮) することが最もよく見られるがんとしても知られている²³⁾。われわれが神経芽腫の自然退縮に着目した理由は以下のとおりである。1) グリオーマと同じく *ras* 遺伝子の変異が見られない^{24),25)}、2) 「がん遺伝子」産物

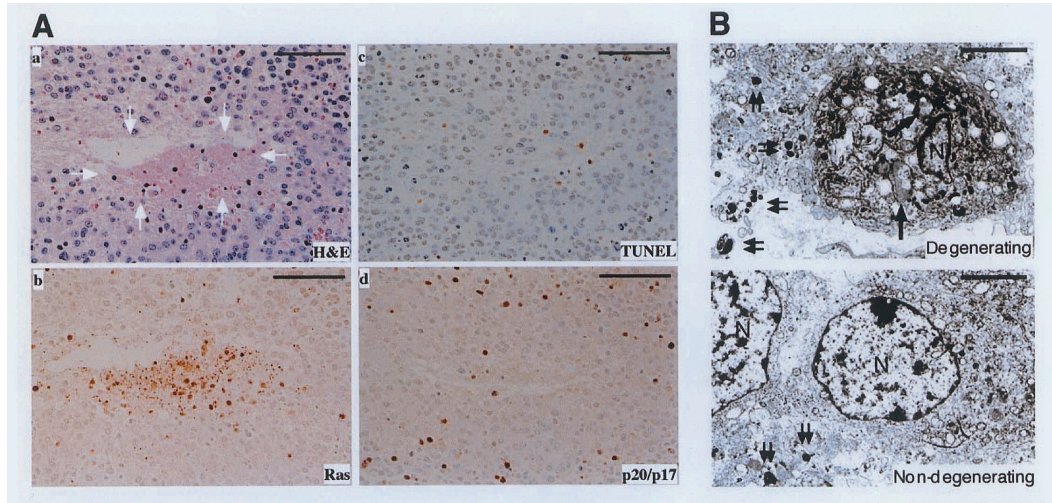


図3. 神経芽腫組織において Ras の高発現部位に一致してみられる non-apoptotic 細胞死
A) 神経芽腫組織の連続切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色 (a)、抗 Ras 抗体 (b) あるいは抗活性化型カスパーゼ3 (p20/p17) 抗体 (d) による免疫染色、TUNEL アッセイ (c) を行った。(a) では変性腫瘍細胞領域を白矢印で囲っている。B) 神経芽腫組織の透過電子顕微鏡像。変性領域に認められた腫瘍細胞 (上) とその周辺に見られた正常 (非変性) 腫瘍細胞 (下) を示した。矢印はオートリソソームと考えられる構造物を、二重矢印は断片化した細胞中のリソソーム構造物を指す。リソソームは上段の (断片化していない) 変性腫瘍細胞の細胞質にも電子密度の高い構造物として多数認められる。N = 核。Scale bar = A) 100 μm、B) 5 μm。(文献31、Kitanaka et al.: J Natl Cancer Inst 2002;94:358 より許可を得て引用・改変)

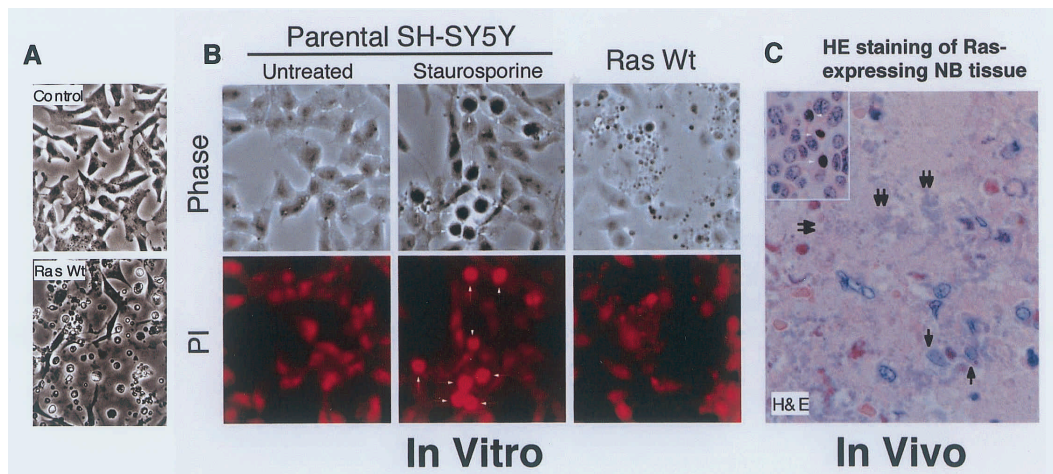


図4. Ras の発現により神経芽腫細胞に誘導される non-apoptotic 細胞死

A) 培養ヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) において野性型 Ras (Ras Wt) を発現誘導し、位相差顕微鏡にて観察した (下)。上はコントロール細胞を示す。B) SH-SY5Y 細胞に野性型 Ras を発現誘導し、細胞死を起こしつつある状態で固定、ヨウ化プロピジウム (PI) による核染色を行った。上段は同じ視野の位相差像。未処理の、あるいは Staurosporine 処理によりアポトーシスを起こした (白矢印) 親株細胞も示した。C) 神経芽腫組織のヘマトキシリン・エオジン染色像。腫瘍細胞が Ras を発現し変性を起こしつつある領域を示す。二重矢印は断片化した核が集集したところを指す。左上の白枠内はこの変性領域に近接して存在する (Ras を高発現しない) 非変性腫瘍細胞からなる領域を示す。白矢印はこの非変性領域に散在性に見られるアポトーシス細胞を指す。アポトーシス細胞は正常腫瘍細胞、Ras を高発現する変性腫瘍細胞と比較して核クロマチンの濃縮が明らかである。尚、(B) と (C) では細胞の大きさが揃うように拡大率を調節しており、アポトーシス細胞および Ras を高発現する non-apoptotic な死細胞の様子を in vitro (B) と in vivo (C) で直接比較することができる。(文献31、Kitanaka et al.: J Natl Cancer Inst 2002;94:358 より許可を得て引用・改変)

である Ras 蛋白質の高発現が神経芽腫では予後「良好」因子となっている^{26),27)}、3) 神経芽腫の自然退縮でおきる腫瘍細胞の消失は免疫系の関与を示す証拠に乏しく腫瘍細胞のプログラム細胞死によるものと考えられる²³⁾、4) にもかかわらず自然退縮がアポトーシスによりおきていることを積極的に示す証拠が得られない^{28),29),30)}。これらの根拠からわれわれは「神経芽腫細胞もグリオーマ細胞と同様に Ras 依存的細胞死に感受性であり、自然退縮を起こしやすく予後のよい神経芽腫では腫瘍細胞における Ras の発現が亢進しておりそういった Ras 高発現細胞がアポトーシスとは異なったプログラム細胞死を起こしているのではないかと考えた。そしてもしそうであれば退縮過程にある神経芽腫細胞が Ras を高発現し non-apoptotic 細胞死

(それもおそらくタイプ2細胞死すなわち autophagic degeneration) を起こしているところを実際に観察することができるのではないかと期待した。そこで神経芽腫腫瘍組織切片の免疫組織化学的解析を試みたところ、予想どおり Ras 蛋白質を高発現する部位に一致して腫瘍細胞の変性、局所的退縮が見られたが、そこにはアポトーシスの特徴である核の濃縮像・TUNEL 陽性像・カスパーゼ3の活性化は認められなかった(図3A)。また変性過程にある Ras 高発現細胞を強拡大で観察すると、明らかな濃縮を示さない核とともに細胞が著しく断片化していた(図4C)。電子顕微鏡による観察を行うと変性腫瘍細胞に autophagic degeneration の特徴が認められた(図3B)。さらに、このような Ras を高発現する変性腫瘍細胞領域は自然

退縮傾向をもつ神経芽腫のサブグループにおいて高頻度に認められたことから、このような細胞死は局所的な退縮のみならず腫瘍全体の退縮傾向と深く関わっていることが示唆された³¹⁾。

一方我々は神経芽腫細胞における Ras の発現が non-apoptotic 細胞死の原因となっているかどうかについても確認を行った。培養ヒト神経芽腫細胞内で Ras の発現を誘導すると細胞の不規則な断片化を伴った細胞死が認められた(図 4A)。また、このような細胞の核の状態をヨウ化プロピジウム染色により観察すると核は細胞とともに不規則に断片化しているものの濃縮像を示しておらず(図 4B)。これは神経芽腫組織において Ras を高発現し変性を起こしつつある腫瘍細胞の特徴(図 4C)をそのまま再現するものであった。また、この Ras により神経芽腫細胞に誘導される細胞死は TUNEL 陰性でカスパーゼ・カスケードの活性化を伴わず・必要ともせず、電子顕微鏡により autophagic degeneration の特徴が認められた。このように Ras の発現により誘導される神経芽腫細胞死の特徴は神経芽腫組織において Ras を高発現する変性腫瘍細胞のそれと全く一致しており、ヒト生体内(神経芽腫腫瘍内)でもやはり Ras の発現が原因となって autophagic degeneration の特徴をもつ non-apoptotic 細胞死がおきているものと考えられた³¹⁾。

以上のような神経芽腫を対象とした研究から、神経芽腫腫瘍のなかで non-apoptotic 細胞死(autophagic degeneration、タイプ 2 細胞死)が起きていること、そしてそれが Ras により制御されるプログラム細胞死であること、さらにはこのような細胞死が腫瘍の退縮に寄与している、すなわちがん排除機構として機能していることが示された。つまり non-apoptotic プログラム細胞死の(病態)生理的存在と意義が初めて明らかになったわけである。そしてもう一点この研究に関して強調すべきことがある。それは「アポトーシス」とらわれているが故に解けなかった謎が「non-apoptotic プログラム細胞

死」に視点を切り替えることによって解決できたということである³²⁾。自然退縮という現象はそれ自体生物学的に興味深い現象であると同時に「そのメカニズムを明らかにすることができれば画期的ながんの治療法につながるのではないか」ということが容易に直感できるため、多くの研究者の関心を惹いてきた。実際アポトーシス研究の隆盛とともにそのメカニズムをアポトーシスで説明しようとする試みが盛んになされたが、結局期待された結果が得られず、この自然退縮のメカニズムに関する研究は迷宮入りとなっていた。それを non-apoptotic プログラム細胞死の観点から見つめなおすことによって、これまでの謎が実にしっくりと説明されるようになったのである。これは決して特殊なケースではない。今後も同様のことが、プログラム細胞死が関与する疾患の研究において経験されるであろう。中でも可能性が高いのは次に述べる神経変性疾患研究であると考えられる。

Non-apoptotic プログラム細胞死と 神経変性疾患

神経変性疾患は過剰なプログラム細胞死が原因となる疾患の代表例としてよく取り上げられる。そして従来はプログラム細胞死イコールアポトーシスと考えられていたため、神経変性疾患は神経細胞の「過剰なアポトーシス」によって生じるものとされてきた。例えば神経変性疾患の代表であるアルツハイマー病について取り上げてみると、アルツハイマー病の原因とされるアミロイド・ベータ蛋白質は確かに *in vitro* では細胞にアポトーシスを誘導できるし、またその細胞死はカスパーゼの阻害剤によって抑制しうることが示されている³³⁾。しかしながら同じ *in vitro* でも用いる細胞の種類(しかも同じ神経系の細胞であっても)が変わるとアポトーシスの特徴を示さない細胞死が誘導されることもまた事実である³⁴⁾。そうすると最も重要となってくるのが実際のアルツハイマー病患者脳においてどのような神経細胞死が起きているかという

ことになるが、実はアルツハイマー病に伴っておきる神経細胞の変性所見としては古くから顆粒空胞変性と呼ばれる特徴的变化が記載されている³⁵⁾。興味深いことに顆粒空胞変性でみられる顆粒・空胞はオートファゴソームに由来することが指摘されており³⁶⁾、このことはアルツハイマー病の神経細胞変性がタイプ2細胞死 (autophagic degeneration) の特徴を有していることを示唆している。実際アルツハイマー病患者脳に TUNEL 法によるアポトーシス検出の試みを行ってみるとアポトーシスを起こしているのは一部のグリア細胞であり、ニューロンの細胞死はアポトーシスでは説明できず他のメカニズムを考慮すべきとの報告がある³⁷⁾。パーキンソン病についても同様のことがあてはまる。まずパーキンソン病患者脳の電子顕微鏡解析の結果からは変性神経細胞が autophagic な変化を起こしていることが示されており³⁸⁾、また TUNEL 解析では陽性反応はグリアに検出されニューロンには見出されなかった³⁹⁾。さらに *in vitro* の実験系ではパーキンソン病の原因とされる変異型アルファ・シヌクレインを神経系細胞内に発現させると autophagic degeneration の特徴を示すカスパーゼ非依存的細胞死が誘導されるなど⁴⁰⁾、パーキンソン病でもやはり non-apoptotic な細胞死が疾患発生メカニズムとなっている可能性が示唆されている。ハンチントン病についても病的ハンチンチンを発現させた神経細胞は autophagic degeneration の特徴を示す細胞変性をきたすことが *in vitro* で観察されており^{41),42)}、一方 *in vivo* (病的ハンチンチンのトランスジェニックマウスと患者のいずれにおいても) でも変性神経細胞はアポトーシスの特徴を示さないことが確認されている⁴³⁾。以上のように神経変性疾患の代表とされるアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病のいずれにおいても、疾患発生の過程で実際におきている神経細胞死は non-apoptotic 細胞死、その中でも特に autophagic degeneration (タイプ2細胞死) であることが強く示唆される。そ

の他にも、例えば筋萎縮性側索硬化症の疾患モデルマウスの解析結果から、変性神経細胞が細胞質の空胞化を示し核変化に乏しくかつ TUNEL 陰性であるなど形態学的にも生化学的にもアポトーシスとは異なることが報告された⁴⁴⁾。また、伸長したポリグルタミン鎖をもつアタキシン3は脊髄小脳変性症タイプ3の原因因子と考えられているが、これを培養神経細胞内で発現させたところ細胞質の空胞化を伴い明らかにアポトーシスとは異なる形態の細胞死が誘導されることが報告されている⁴⁵⁾。同じくポリグルタミン病である Machad-Joseph 病の原因遺伝子を細胞内で発現させた場合もアポトーシスとは異なる細胞死が誘導され、この細胞死はカスパーゼ非依存的であるが SEK キナーゼを介する細胞内シグナル伝達経路により制御されていることが明らかにされた⁴⁶⁾。このように実に様々な神経変性疾患においてアポトーシスと異なった細胞死の関与が示唆されている。もちろん、これら神経変性疾患で見られる細胞死の大多数については遺伝子本来の機能発現により誘導される「プログラム細胞死」であることが必ずしも確認されているわけではない。しかしながら、少なくともプログラム細胞死の観点から神経変性疾患研究を行うのであるならば、アポトーシスだけを念頭においている限り疾患の本質に迫れないことは自明である。そしてこのことは他の疾患を対象とする場合もまた然りである。

おわりに

本稿ではプログラム細胞死研究の流れを辿りながら、それまでずっとアポトーシスの陰に隠れていた non-apoptotic プログラム細胞死研究に陽が当たり始めるところまでを紹介してきた。成熟期に入ったアポトーシス研究に対して non-apoptotic プログラム細胞死研究はまだ揺籃期にあると言える。今後 non-apoptotic プログラム細胞死研究においてはその制御機構解

明が研究の中心となり、近い将来成長期を迎えるものと思われる。そしてこういった細胞死の制御機構が明らかになれば、例えばがんではアポトーシスに耐性になったがん細胞に対して第二の自殺機構を活性化させて効率よく殺傷する方法が考案できるかも知れない。また神経変性疾患では non-apoptotic 細胞死のシグナル伝達をブロックするような薬剤が予防あるいは治療薬として使えるようになるかも知れない。本稿では主に疾患の観点から non-apoptotic プログラム細胞死について解説したが、疾患研究を通じてその制御機構を明らかにすることができれば、(病的状態ではなく)生理的に起きている non-apoptotic 細胞死のメカニズムの理解にもつながり、ひいては non-apoptotic プログラム細胞死の生理的役割についても明らかにすることが可能となる。このように non-apoptotic プログラム細胞死研究は今後大きな発展の可能性を秘めているが、それはひとえに細胞死研究を行う研究者が「プログラム細胞死には多様性があり、アポトーシスだけではない」ということをどれだけ理解しているにかかっていると一言しても過言ではない。

本論文で紹介した Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死に関する研究は国立がんセンター研究所生物物理部において行ったものであり、神経芽腫組織を用いた解析は神奈川県立こども医療センター病理科の多大なるご協力のもとに行った。この場をお借りしてこれまでご指導・ご協力いただいた諸先生方、共同研究者の皆様方に厚く御礼申し上げます。

尚、本論文の図3、図4については Oxford University Press の許可のもと文献31より引用・改変を行った。

文 献

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
2. Lockshin RA, Williams CM: Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol* 1965; 11: 123-133
3. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306
4. Schweichel JU, Merker HJ: The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7: 253-266
5. Clarke PG: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 195-213
6. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA: Cell death: programmed, apoptosis, necrosis or other? *Cell Death Differ* 1995; 2: 87-96
7. Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; 44: 817-829
8. Yuan JY, Horvitz HR: The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 1990; 138: 33-41
9. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J: Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 1993; 75: 653-660
10. Hengartner MO, Horvitz HR: *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994; 76: 665-676
11. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413
12. Melino G, Knight RA, Green DR: Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ* 2001; 8: 1-3
13. Check E: Worm cast in starring role for Nobel

- prize. *Nature* 2002; 419: 548-549
14. Marx J: Nobel Prize in Physiology or Medicine. Tiny worm takes a star turn. *Science* 2002; 298: 526
15. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652
16. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al.: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171
17. Kumar S, Lavin MF: The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 1996; 3: 255-267
18. Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354
19. Kitanaka C, Kuchino Y: Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; 6: 508-515
20. Leist M, Jaattela M: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589-598
21. Abraham MC, Shaham S: Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 184-193
22. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, et al.: Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2281-2290
23. Pritchard J, Hickman JA: Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 1994; 344: 869-870
24. Ballas K, Lyons J, Janssen JW, Bartram CR: Incidence of ras gene mutations in neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 1988; 147: 313-314
25. Moley JF, Brother MB, Wells SA, Spengler BA, Biedler JL, Brodeur GM: Low frequency of ras gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers. *Cancer Res* 1991; 51: 1596-1599
26. Tanaka T, Slamon DJ, Shimada H, Shimoda H, Fujisawa T, Ida N, et al.: A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis. A retrospective study of 103 cases. *Cancer* 1991; 68: 1296-1302
27. Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T: Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer* 1998; 83: 1626-1633
28. Koizumi H, Wakisaka M, Nakada K, Takakuwa T, Fujioka T, Yamate N, et al.: Demonstration of apoptosis in neuroblastoma and its relationship to tumour regression. *Virchows Arch* 1995; 427: 167-173
29. Ikeda H, Hirato J, Akami M, Matsuyama S, Suzuki N, Takahashi A, et al.: Bcl-2 oncoprotein expression and apoptosis in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 805-808
30. Tonini GP, Mazzocco K, di Vinci A, Geido E, de Bernardi B, Giaretti W: Evidence of apoptosis in neuroblastoma at onset and relapse. An analysis of a large series of tumors. *J Neurooncol* 1997; 31: 209-215
31. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K, et al.: Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 358-368
32. Brooksbank C: RAS, the magician. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 249
33. Jordan J, Galindo MF, Miller RJ: Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 1997; 68: 1612-1621
34. Gschwind M, Huber G: Apoptotic cell death

- induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem* 1995; 65: 292-300
35. Tomlinson BE, Kitchener D: Granulovacuolar degeneration of hippocampal pyramidal cells. *J Pathol* 1972; 106: 165-185
36. Okamoto K, Hirai S, Iizuka T, Yanagisawa T, Watanabe M: Reexamination of granulovacuolar degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82: 340-345
37. Jellinger KA, Stadelmann C: Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2001; 3: 31-40
38. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, et al.: Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997; 12: 25-31
39. Jellinger KA: Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 1-29
40. Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA: Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* 2001; 21: 9549-9560
41. Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, et al.: Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000; 20: 7268-7278
42. Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, et al.: Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1243-1254
43. Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW: Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8093-8097
44. Migheli A, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Girelli M, Schiffer D, et al.: Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 1999; 5: 966-967
45. Evert BO, Wullner U, Schulz JB, Weller M, Groscurth P, Trottier Y, et al.: High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1169-1176
46. Yasuda S, Inoue K, Hirabayashi M, Higashiyama H, Yamamoto Y, Fuyuhiko H, et al.: Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes Cells* 1999; 4: 743-756

Non-apoptotic Programmed Cell Deaths: Existence and Significance of Programmed Cell Deaths Having Morphology and Mechanism Distinct from Apoptosis

Chifumi Kitanaka

*Department of Molecular Cancer Science,
Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan*

ABSTRACT

Cells comprising multi-cellular organisms harbor intrinsic genetic programs to commit "suicide". The organisms benefit from cellular suicide executed by the activation of such genetic programs, which contributes to normal development and homeostasis of the organisms, in other words, to disease prevention. Until recently, the terms "programmed cell death (PCD)" and "apoptosis" have been used interchangeably. However, mounting evidence now unambiguously points to the existence of cell deaths genetically regulated yet having morphology and mechanism distinct from apoptosis (non-apoptotic PCDs), giving rise to the notion that there is "diversity" in PCD. Direct as well as indirect evidence also implicates this non-apoptotic type of PCDs in human pathologies such as neurodegenerative diseases and cancer. Here in this article, I overview the advances made in this emerging research field of non-apoptotic PCD, placing particular emphasis on the idea of "diversity in PCD" as a key to understanding pathologies in which PCD plays a critical role.

Key words : programmed cell death, apoptosis, non-apoptotic, autophagic degeneration, Ras